

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2001 02 28

申 请 号： 01 1 04367.9

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 重组高效复合干扰素用作乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制剂

申 请 人： 四川省生物工程研究中心

发明人或设计人： 魏光文； 郭融冰； 张人怀



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 9 月 25 日

权 利 要 求 书

- 1、一种重组高效复合干扰素的应用，其特征是它作为一种制剂对乙型肝炎病毒 DNA、HBsAg、HBeAg 均有抑制作用。
- 2、根据权利要求 1 所述的重组高效复合干扰素的应用，其特征是该制剂是通过一定生产工艺得到的，它具有美国专利号 4695623 和 4897471 所描述的干扰素不具备的功效及对其它病毒如艾滋毒等的抑制作用的应用。
- 3、一种权利要求 1 或 2 所述的重组高效复合干扰素，其特征是具有蛋白质二级及高级结构。
- 4、一种权利要求 1 或 2 所述的重组高效复合干扰素，其特征是它含有应用特定的启动子构建的重组高效复合干扰素高效表达系统，包括大肠杆菌、酵母及 CHO 表达系统。
- 5、根据权利要求 4 所述的重组高效复合干扰素，其特征是所说的启动子包括 P_{BAD} 。
- 6、根据权利要求 4 所述的重组高效复合干扰素，其特征是其中高效复合干扰素基因是人工合成的 cDNA，且其序列根据宿主密码子偏爱性而作相应调整。
- 7、一种生产权利要求 1 或 2 中所述的重组高效复合干扰素的生产工艺。
- 8、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是它包括从表达产物中提取重组高效复合干扰素的方法，包括所用的层析介质、试剂及其浓

度，提取时的温度、时间等。

- 9、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是使变性的重组高效复合干扰素恢复其稳定的具有权利要求 1 或 2 所述的药理作用的蛋白质空间结构的方法，包括所用的试剂、试剂的浓度等。
- 10、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是其中包括分离纯化重组高效复合干扰素的工艺。
- 11、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是该工艺还包括将高度纯化的重组高效复合干扰素制成冻干制剂的配方及工艺。
- 12、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是该工艺还包括将高度纯化的重组高效复合干扰素制成的水溶液制剂的配方及工艺。
- 13、重组高效复合干扰素制备成抑制乙型肝炎病毒 HBs 及 HbeAg 的药物的应用。
- 14、根据权利要求 13 所述的应用，其特征是重组高效复合干扰素选自 rSIFN-col、rSIFN-co2、rSIFN-co3。
- 15、根据权利要求 13 所述的应用，其特征是重组高效复合干扰素是通过口服、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、鼻内、粘膜给药。
- 16、根据权利要求 13 所述的应用，其特征是重组高效复合干扰素是通过注射方式给药 9 μ g、15 μ g，每周 3 次，疗程 24 周。

说明书

重组高效复合干扰素用作乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制剂

本发明涉及重组高效复合干扰素(Recombinant Super Compound Interferon, rSIFN-co), 的应用。

重组高效复合干扰素是将几种天然人 α -干扰素亚型中最常见的保守性氨基酸结构用遗传工程的方法以建构而成的一种全新干扰素分子, 美国专利 4695623、4897471 中对此种干扰素已经有所描述, 已证明 rSIFN-co 具有广谱的干扰素活性, 有较强的抗病毒和抗肿瘤及天然杀伤细胞活性, 美国专利 5372808 公开了用重组高效复合干扰素治疗疾病的方法, 中国专利 97193506 公开了应用重组高效复合干扰素再次治疗丙型肝炎的方法, 中国专利 98114663 公开了重组高效复合干扰素的制备方法和治疗乙型肝炎和丙型肝炎的用途。美国食品与药品管理局(FDA)已于 1997 年底批准了美国 Amgen 公司用大肠杆菌生产的 rSIFN-co 用于临床丙肝病人的治疗。

对于乙型肝炎病人的诊断, 当检测出表面抗原 (HBsAg) 阳性和 e 抗原 (HBeAg) 阳性者即可判定为乙型肝炎患者, 目前临床上采用各种类型的 α -干扰素对慢性乙型肝炎患者进行治疗, 其作用机理是: 干扰素与细胞表面的特殊膜受体结合而发挥其抗 DNA 和 RNA 的作用。包括对某些酶的诱导作用阻止受病毒感染细胞中病毒的复制。

但用干扰素治疗乙型肝炎的疗效始终未被证实。

本发明惊奇的发现，重组高效复合干扰素对于乙型肝炎表面抗原和乙型肝炎 e 抗原具有有效的抑制作用，从而证明重组高效复合干扰素可以通过抑制乙型肝炎表面抗原和乙型肝炎 e 抗原达到治疗乙型肝炎的目的。

本发明的目的是提供用于治疗乙型肝炎的重组高效复合干扰素药物，通过服用这种药物抑制乙型肝炎表面抗原和乙型肝炎 e 抗原，使之降低到正常水平，达到治疗目的。

本发明是通过以下方式实现的：

本发明首先通过基因重组技术制备出具有如图一序列的重组高效重组高效复合干扰素，本发明的重组技术利用大肠杆菌优先表达密码子，在保证氨基酸序列不变的情况下，对其 DNA 编码序列进行了重新设计，然后人工合成其 rSIFN-co 全长的 cDNA 基因。

本发明采用重组 DNA 技术将上述 rSIFN-co 全长 cDNA 序列克隆到大肠杆菌高效表达载体中去，然后利用 L-阿拉伯糖诱导/活化表达调控机制激活载体中的强 P_{BAD} 启动子介导下游的 rSIFN-co 基因高效表达。这一阿拉伯糖诱导/活化表达调控系统比通常遗传工程生产中所采用的温控、pH 调控、IPTG 诱导等系统有明显的优点：(1)通常采用的几种调控系统都是以“去阻遏”的形式解除对功能启动子的抑制作用，从而启动子可介导下游基因的表达。改变温度、pH 值本身以及加入 IPTG 诱导物等都对启动子无直接激活作用。在我们采用的系统中，阿拉伯糖与阻遏蛋白 (AraC) 结合后，不仅解除了对 P_{BAD} 启动子的抑制作用，同时“阿拉伯糖- AraC 复合物”又可直接激活 P_{BAD} 启动子介导下游基因的表达。所以阿拉伯糖诱导/活化调控系统是一种

比其它几种系统更有效的大肠杆菌高效表达系统；(2) P_{BAD} 启动子活化的程度与加入的 L-阿拉伯糖剂量成线性关系。这样可以直接通过改变阿拉伯糖浓度而调节外源基因产物的表达量。这一特性对改变包涵体的形成等非常有意义。加入阿拉伯糖比改变温度/pH 等更容易直接控制外源基因产物在大肠杆菌中的表达；(3)L-阿拉伯糖来源丰富，价廉、无毒性，这克服其它诱导物如 IPTG 在这方面的缺点。

本发明用阿拉伯糖诱导/活化系统建立了高效、稳定的 rSIFN-co 表达大肠杆菌工程菌株，通过对该菌株在适宜的条件下的培养发酵获得了大量高纯度的 rSIFN-co 蛋白以用于本发明的研究和临床治疗。

本发明的应用方法是通过患者服用重组高效复合干扰素达到治疗目的，患者服用的重组高效复合干扰素可以制成各种剂型如：片剂、胶囊、口服液、贴剂、注射剂、喷雾剂、栓剂、溶液制剂，推荐的剂型为注射剂，可皮下或静脉注射给药，药物组合物中的载体可使用任何一种适宜的药物可接受的载体，这些载体可以是糖类、纤维素制品、粘合剂、崩解剂、润滑剂、填充剂、增溶剂、缓冲剂、防腐剂、增稠剂、配合剂和其他佐剂。

图一：为 rSIFN-co 的 DNA 编码序列以及推断的氨基酸序列

本发明通过以下实验验证了重组高效复合干扰素对乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制作用，实验方法如下：

溶剂及配制方法：受试药物配制时向每支原料瓶内加入 1ml 生理盐水，溶解后，再根据所设不同剂量组浓度差异用 MEM 培养液调配。现用现配。

保存条件：4℃冰箱保存。

对照药品：先灵公司生产的 IFN- α 2b 干扰能为冻干制剂，每支 3×10^6 U
实验时用培养液配成 3×10^6 IU/ml 溶液。2.2.15 细胞：乙型肝炎病毒
(HBV)DNA 克隆转染人肝癌细胞(Hep G2)的

2.2.15 细胞系：美国 Mount Sinai 医学中心构建，我室引进后自行传代
培养。

试剂

Eagles MEM 干粉，美国 Gibco 公司产品；胎牛血清，美国 Hyclone Lab
公司产品；G-418(Geneticin)，MEM 配制，美国 Gibco 公司产品；L-谷氨酰
胺，京科化学试剂公司进口分装；HBsAg，HBcAg 固相放射免疫测定盒，
购自中国同位素公司北方免疫试剂研究所；卡那霉素，华北制药厂产品；
Lipofectin，美国 Gibco 公司产品。

实验用品及仪器

培养瓶，丹麦 Tuncclon TM；培养板 96 孔板、24 孔，美国 Corning 公司
产品；二氧化碳孵箱，美国 Shel-Lab 产品；

细胞培养液及试剂配制

MEM 培养液 100ml：含胎牛血清 10%，3%谷氨酰胺 1%，G418 $380 \mu\text{g/ml}$ ，
卡那霉素 50U/ml。

试验方法

2.2.15 细胞培养

在长满 2.2.15 细胞的培养瓶内加 0.25%胰酶，37℃消化 3 分钟，加培养液吹打，1:3 传代，10 天长满。

药物对细胞毒性试验

实验分无药物细胞对照组和不同药物浓度给药组。细胞消化，配制成每毫升 10 万个细胞，接种培养板，96 孔板每孔 200 μ l，37℃5%CO₂ 培养 24 小时，细胞长成单层后进行实验。高效重组高效复合干扰素用培养液配制成 1.8 $\times 10^7$ IU/ml 溶液，2 倍稀释加入 96 孔细胞培养板，每浓度 3 孔，每 4 天换同浓度药液，以观察细胞病变为指标，8 天显微镜下观察细胞病变，完全破坏为 4；75%为 3；50%为 2；25%为 1；无病变为 0。计算每浓度药液平均细胞病变程度和抑制%。按 Reed Muench 法计算半数有毒浓度 (TC50) 和最大无毒浓度 (TC0)。

$$TC50 = \text{Antilog} \left(B + \frac{50-B}{A-B} \times C \right)$$

A=log>50%药物浓度 B=log<50%药物浓度 C=log 稀释倍数

对 HBeAg、HBsAg 抑制试验

试验设 HBeAg、HBsAg 阳性对照组，阴性对照组，细胞对照组及不同药物浓度给药组。每毫升 70 万个 2.2.15 细胞接种 6 孔细胞培养板，每孔 3ml，37℃5%CO₂ 培养 24 小时，加无毒浓度以下 3 倍稀释试验药液，5 个稀释度分别为 4.5 $\times 10^6$ IU/ml、1.5 $\times 10^6$ IU/ml、0.5 $\times 10^6$ IU/ml、0.17 $\times 10^6$ IU/ml、

和 0.056×10^6 , 每浓度 1 孔, 37°C 5% CO_2 培养, 每 4 天换原浓度药液培养, 第 8 天时收获培养液, -20°C 冰冻保存。试验重复三批, 分别测定 HBsAg 和 HBeAg。HBsAg 和 HBeAg 测定采用中国同位素公司北方免疫试剂研究所产品, 固相放射免疫测定盒测定, 方法见说明书, 用 γ -计数器测定每孔 cpm 值。

药物效果计算: 计算细胞对照及每浓度 cpm 均值及标准差, P/N 值如抑制百分率(%), 半数有效浓度 (IC50) 及选择指数 (SI)。

$$\text{①抗原抑制百分率 (\%)} = \frac{\text{细胞对照 cpm} - \text{给药组 cpm}}{\text{细胞对照 cpm}} \times 100$$

②计算药物抑制抗原半数有效浓度 (IC50):

$$\text{IC}_{50} = \text{Antilog} \left(B + \frac{50 - B}{A - B} \times C \right)$$

A = log > 50% 药物浓度 B = log < 50% 药物浓度 C = log 稀释倍数

③辉特福重组高效复合干扰素在 2.2.15 细胞培养内对 HBsAg 和 HBeAg 的选择指数 (SI), 按其对细胞毒性指标细胞病变 (SI) 计算。

$$\text{SI} = \frac{\text{细胞病变毒性 TC}_{50}}{\text{IC}_{50}}$$

④以 t 检验法计算各稀释度 HBsAg、HBeAg 和对照组间 cpm 的差别。

对 2.2.15 细胞 DNA 抑制实验

2.2.15 细胞上清中 HBV-DNA 提取: 每毫升 70 万个 2.2.15 细胞接种 6 孔

细胞培养板，每孔 3ml 接种于培养板，接种后 24 小时加入干扰素，每 4 天换原浓度药液培养，加药后培养 8 天，收取上清液，加入聚乙二醇沉淀，离心去上清，加入酵母 t-RNA，加蛋白酶 K 裂解细胞，等体积苯酚：氯仿：异戊醇抽提 2 次，高速 10,000g 离心，取上清，加无水乙醇沉淀核酸，真空抽干，重溶于 TE 缓冲液中作为样品。

斑点杂交：一点样：取 20ul (DNA 含量 25μg)，加变性液，变性，并用中和液将其中和，并以 20X SSC 缓冲液对倍稀释各点至 1:128 倍稀释于硝酸纤维素膜上，膜置室温凉干后放置到 80℃ 烤箱中干烤，以固定 DNA。预杂交：将硝酸纤维素膜装于塑料袋中加预杂交液 6ml，置水浴中预杂交 2 小时。→杂交：加入 5×10^7 cpm α - 32 P-dCTP 标记的变性 HBV-DNA 探针，于 42℃ 水浴中杂交 14-18 小时。↓洗膜：以 0.1X SSC/0.1% SDS 分别在室温和 65℃ 洗膜。放射自显影：吸干膜上流动水分，夹片、曝光。以常规方法冲洗 X 光片，扫描仪扫描光片，用 gel-pro 软件测定密度，计算抑制率及 IC₅₀。

$$2.2.15 \text{ 细胞培养液中 HBV-DNA 抑制} = \frac{\text{CIOD} - \text{TIOD}}{\text{CIOD}} \times 100\%$$

Southern blot: 2215 细胞内 HBV——DNA 提取：2215 细胞加药后培养 8 天，吸除培养液收取细胞，加入细胞裂解液，裂解细胞，等体积苯酚：氯仿：异戊醇抽提 2 次，高速 10,000g 离心，取上清，加无水乙醇沉淀核酸，真空抽干，重溶于 20μl TE 缓冲液中，加入 6X DNA 样品缓冲液，将样品加于 1.5% 琼脂糖胶上电泳，1V/cm，恒压，14-18 小时。→变性、杂交：将胶分别浸于 HCl、变性液、中和液中。↓转膜：按程序将 DNA 转至 Hybond-N 膜上。同斑点杂交一同进行烤膜、杂交、曝光。扫描仪扫描光片，以 gel-pro

凝胶分析软件分析相对密度，计算抑制率及 IC₅₀。

统计与分析方法：

各组计量资料结果用算术平均数(\bar{x})±标准差(S)表示。根据中国《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》的有关新药药效学研究中统计处理的指导原则，计数资料用 Fisher 精确检验，计量资料选择 Student t 检验进行各组均数差异显著性。

本发明通过几批实验的结果(表一、表二)证明，重组高效复合干扰素具有明显的抑制乙型肝炎表面抗原和 e 抗原活性，而对照组干扰能组不具有上述活性。有限的临床病例也证实了慢性活动性乙型肝炎患者，通过服用重组高效复合干扰素使乙型肝炎表面抗原和 e 抗原阳性降低或恢复到正常水平。

本发明应用的重组高效复合干扰素制剂可通过如下实施例制备：

实施例一：冻干注射剂的制备

- | | |
|------------------|--------------|
| a. 重组高效复合干扰素 | 300 万 IU; |
| b. 枸橼酸 | 0.2 毫克; |
| c. 磷酸氢二钠 | 2.5 毫克; |
| d. 氯化钠 | 4.0 毫克; |
| e. 右旋糖酐 | 20 毫克; |
| f. 聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯 | 0.1 毫升; |
| g. 注射用水 | 适量加至 1.0 毫升。 |



01.02.20

11

制备工艺:

按处方称料,用无菌无热原注射水溶解,除菌过滤用 0.22 μ m 孔径滤膜除菌过滤,保存于 8 \pm 2 $^{\circ}$ C,取样作无菌和热原检查合格后分装于西林瓶中,单剂量装每瓶 1.1ml。分装后放置到冻干机中冷冻干燥。

实施例二:水溶液注射剂的制备

- | | |
|------------------|--------------|
| a. 重组高效复合干扰素 | 300 万 IU; |
| b. 枸橼酸 | 0.2 毫克; |
| c. 磷酸氢二钠 | 2.5 毫克; |
| d. 氯化钠 | 4.0 毫克; |
| e. 右旋糖酐 | 20 毫克; |
| f. 聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯 | 0.1 毫升; |
| g. 注射用水 | 适量加至 1.0 毫升。 |

制备工艺:

按处方称料,用无菌无热原注射水溶解,除菌过滤用 0.22 μ m 孔径滤膜除菌过滤,保存于 8 \pm 2 $^{\circ}$ C,取样作无菌和热原检查合格后分装于密闭容器中。分装于西林瓶中,单剂量装每瓶 1.1ml。分装后成品置 2—10 $^{\circ}$ C 下暗处保存。

表一：测定 rSIFN-con 对乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制率的实验结果：

第一批实验

e 抗原	细胞对照	15010			空白		0		稀释倍数		3	1C50	602.7446016
浓度	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率			
900	9026	8976	10476	0.436227	0.43935	0.345659	0.407079	0.945909	0.592921	0.614693546			
300	9616	12082	10098	0.3993754	0.245347	0.369269	0.337997	0.5388299	1.254924	0.300392321			
100	9822	16002	12800	0.386508	0.0005	0.2005	0.195836	0.200833	2.059088	0.08867188			
33.33333	15770	19306	16824	0.014991	0	0	0.004997	0.0049969	3.054091	0.001633453			
11.11111	19172	22270	18934	0	0	0	0	0	4.054091	0			
表面抗原	细胞对照	11714			空白		0		稀释倍数		3	1C50	541.7736749
浓度	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率			
900	7706	7240	7114	0.342155	0.381936	0.392693	0.372261	0.922258	0.627739	0.595006426			
300	8856	7778	9476	0.2439816	0.336008	0.191053	0.257014	0.5499972	1.370724	0.286349225			
100	10818	10720	10330	0.07649	0.084856	0.118149	0.093165	0.292983	2.27756	0.113977019			
33.33333	10744	11114	10570	0.082807	0.051221	0.097661	0.07723	0.1998179	3.20033	0.058767408			
11.11111	10672	9352	10810	0.068953	0.201639	0.077173	0.122588	0.122588	4.077742	0.02918541			

第二批实验

第二批实验																				
e 抗原		细胞对照			16962			空白		0			稀释倍数		3		IC50		365.9357846	
浓度		第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率						
900		7818	8516	9350	0.554378	0.514592	0.467054	0.512008	1.371181	0.487992	0.737521972			0.737521972						
300		10344	10628	9160	0.4103967	0.394209	0.477884	0.427497	0.8591731	1.060496	0.447553245			0.447553245						
100		12296	14228	13262	0.299134	0.18901	0.244072	0.244072	0.4316577	1.816423	0.19201839			0.19201839						
33.33333		15364	17414	16188	0.124259	0.00741	0.77291	0.069653	0.1876045	2.74677	0.063933386			0.063933386						
11.11111		17386	13632	15406	0.009006	0.222982	0.121865	0.117951	0.117951	3.628819	0.03148073			0.03148073						
表面抗原		细胞对照			空白		0			稀释倍数		3		IC50		611.0919568				
浓度		第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率						
900		5784	6198	5792	0.498265	0.462353	0.497571	0.486063	0.893477	0.513937	0.634835847			0.634835847						
300		7150	8534	8318	0.379771	0.259715	0.278452	0.30598	0.4074138	1.207957	0.252210647			0.252210647						
100		9830	11212	10210	0.147294	0.027412	0.11433	0.096345	0.101431	2.111612	0.04583464			0.04583464						
33.33333		13942	12368	13478	0	0	0	0	0.0050891	3.111612	0.001632835			0.001632835						
11.11111		12418	11634	11352	0	0	0.015267	3.005089	0.005089	4.106523	0.001237728			0.001237728						

第三批实验

e 抗原 浓度	细胞对照			17544			空白			0			稀释倍数			3			IC50			382.049635		
	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率	1-累加	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率		
900	9702	9614	8110	0.428016	0.433204	0.521872	0.461031	1.315983	0.538969	0.709599543														
300	8914	10032	8870	0.4744723	0.40856	0.477066	0.453366	1.085003	0.440853127															
100	16312	12688	13934	0.008021	0.251975	0.178517	0.156271	0.402586	0.172641621															
33.33333	15080	12814	13288	0.110954	0.244547	0.216602	0.190701	2.738631	0.082519158															
11.11111	21928	15366	15728	0	0.094093	0.072751	0.0055615	3.683017	0.014875633															
表面抗原 浓度	细胞对照			11528			空白			0			稀释倍数			3			IC50			594.7027149		
	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率	1-累加	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率		
900	5616	6228	5346	0.496864	0.442035	0.521054	0.486651	0.763125	0.513349	0.597838293														
300	8542	8590	7096	0.234725	0.230425	0.364272	0.276474	1.236875	0.182690031															
100	11420	11360	11394	0	0	0	0	2.236875	0															
33.33333	12656	11582	13110	0	0	0	0	3.236872	0															
11.11111	13142	12336	13342	0	0	0	0	4.236875	0															

F 抗原: IC50 均值 450.2434 标准差 132.315479

表面抗原: IC50 均值 649.1894 标准差 42.29580

表二：干扰能（IFN- α 2b）第一批实验

e 抗原	细胞对照			17544			空白			0			稀释倍数		3	IC50	FALSE
浓度	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率
300	14918	11724	9950	0	0.029711	0.176529	0	0	0	0.068747	0.068747	0.931253	0.068746724	0	0	0.931253	0.068746724
100	14868	16890	15182	0	0	0	0	0	0	0	0	1.931253	0	0	0	1.931253	0
33.33333	16760	21716	16100	0	0	0	0	0	0	0	0	2.931253	0	0	0	2.931253	0
11.11111	20854	15042	16168	0	0	0	0	0	0	0	0	3.931253	0	0	0	3.931253	0
3.703704	12083	12083	12083	0	0	0	0	0	0	0	0	4.931253	0	0	0	4.931253	0
表面抗原	细胞对照			10886			空白			0			稀释倍数		3	IC50	FALSE
浓度	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率	累加抑制率
300	9226	8196	9658	0.152489	0.247106	0.521054	0	0	0	0.1708	0.189295	0.8292	0.185857736	0	0	0.8292	0.185857736
100	10946	10340	10828	0	0.050156	0.364272	0	0	0	0.018495	0.018495	1.810705	0.010110817	0	0	1.810705	0.010110817
33.33333	12250	12980	13934	0	0	0	0	0	0	0	0	2.810705	0	0	0	2.810705	0
11.11111	12534	12342	12000	0	0	0	0	0	0	0	0	3.810705	0	0	0	3.810705	0
3.703704	10886	10886	10886	0	0	0	0	0	0	0	0	4.810705	0	0	0	4.810705	0

说明书附图

```

5'          11          21          31          41          51
+1 M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A
1 ATGTGTGATT TACCTCAAAC TCATTCTCTT GGTAACCGTC GCGCTCTGAT TCTGCTGGCA
TACACACTAA ATGGAGTTTG AGTAAGAGAA CCATTGGCAG CGCGAGACTA AGACGACCGT

5'          71          81          91          1          11
+1 O M R R I S P F S O L K D R H D F G F P
61 CAGATGCGTC GTATTTCCCC GTTTAGCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGCTTTCCG
GTCTACGCAG CATAAAGGGG CAAATCGACG GACTTTCTGG CAGTGCTGAA GCGAAAGGC

5'          31          41          51          61          71
+1 Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E
121 CAAGAAGAGT TCGATGGCAA CCAATTCCAG AAAGCTCAGG CAATCTCTGT ACTGCACGAA
GTTTCTCTCA AGCTACCGTT GGTTAAGGTC TTTCGAGTCC GTTAGAGACA TGACGTGCTT

5'          91          1          11          21          31
+1 M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
181 ATGATCCAAC AGACCTTCAA CCTGTTTTCC ACTAAAGACA GCTCTGCTGC TTGGGACGAA
TACTAGGTTG TCTGGAAGTT GGACAAAAGG TGATTTCTGT CGAGACGACG AACCTGCTT

5'          51          61          71          81          91
+1 S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C
241 AGCTTGCTGG AGAAGTTCTA CACTGAACTG TATCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCATGC
TCGAACGACC TCTCAAGAT GTGACTTGAC ATAGTCGTCG ACTTGCTGGA CTTCTGTAAG

5'          11          21          31          41          51
+1 V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
301 GTAATCCAGG AAGTTGGTGT AGAAGAGACT CCGCTGATGA ACGTCGACTC TATTCTGGCA
CATTAGGTCC TTCAACCACA TCTTCTCTGA GCGGACTACT TGCAGCTGAG ATAAGACCGT

```

图一 rSIFN-co 的 DNA 编码序列以及推断的氨基酸序